

ISOLASI dan AMPLIFIKASI GEN Rv 1984c PENGKODE PROTEIN CFP 21 *Mycobacterium tuberculosis* SEBAGAI ANTIGEN UNTUK IMMUNODIAGNOSTIK TUBERKULOSIS LATEN

Ian Imanuel Fidhatami¹, Rosana Agus², Muh. Nasrum Massi³, Sjafaraenan²

1. Mahasiswa Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, 90245
2. Dosen Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar, 90245
3. Dosen Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, 90245

e-mail : ian.fidhatami@yahoo.com

ABSTRAK

Gen Rv 1984c merupakan gen yang terdapat pada *Mycobacterium tuberculosis* yang berada di wilayah RD₂ yang akan mengkode protein CFP 21. Gen ini diketahui mampu memperoleh sebuah jenis reaksi hipersensitivitas yang kuat pada penderita tuberkulosis.

Telah dilakukan penelitian dengan judul “Isolasi dan Amplifikasi Gen Rv 1984c Pengkode Protein CFP 21 *Mycobacterium tuberculosis* sebagai Antigen untuk Immunodiagnostik Tuberkulosis Laten. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi dan mengamplifikasi gen Rv 1984c pengkode protein CFP 21 *Mycobacterium tuberculosis* sebagai antigen untuk mendiagnostik tuberkulosis laten. Metode yang digunakan adalah mengisolasi DNA kromosom dari sputum penderita TB dan mengamplifikasi gen CFP 21 dengan PCR menggunakan primer spesifik Forward 5'-GAT CCG TGT TCG GAC ATC GCG GT-3' dan Reverse 5'-TCC GCC GTG ATC GAG CCT GTT CGC-3' dengan panjang basa DNA 608 bp. Dari hasil amplifikasi dengan PCR terhadap gen Rv 1984c yang mengkode antigen CFP 21 dari *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh pita DNA berukuran 608 bp. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa hasil isolasi dan amplifikasi gen Rv 1984c dari *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh suatu pita DNA berukuran 608 bp.

Kata Kunci : Tb Laten, CFP 21, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR

ABSTRACT

Gene Rv 1984c is a gene which contained by around RD₂ of *Mycobacterium tuberculosis* and will encode protein CFP 21. This gene is reportedly could obtain a strong reaction of hypersensitivity for people who contracted tuberculosis.

Research about Isolation and Amplification of Protein-Coding Gene Rv 1984c CFP 21 *Mycobacterium tuberculosis* as Antigen for Latent Tuberculosis Immunodiagnosics has been done. This research aims to isolate and amplify the gene encoding the protein CFP 21 in 1984c Rv *Mycobacterium tuberculosis*

antigens for latent tuberculosis immunodiagnostic. Therefore this research used method with isolating chromosomal DNA from the phlegm of patients with TB and amplifying the CFP 21 gene by PCR using specific primers Forward 5'-GAT CCG TGT GAC ATC TCG GCG GT-3' and Reverse 5'-TCC GCC ATC GAG CCT GTG GTT CGC-3' with a DNA base length of 608 bp. From the results of the PCR amplification of the gene that encodes the Rv 1984c antigen of *Mycobacterium tuberculosis* CFP 21 obtained 608 bp DNA sized band. Based on the results of research conducted, it can be concluded that the result of the isolation and amplification of genes of *Mycobacterium tuberculosis* Rv 1984c obtained a 608 bp DNA sized band.

Keywords: Latent Tb, CFP 21, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR

PENDAHULUAN

Tuberkulosis atau TB adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Pertambahan jumlah penduduk yang relatif cepat, diiringi pertambahan usia harapan hidup manusia, menambah jumlah penduduk di dunia. Jumlah penduduk yang sebesar ini akan mengakibatkan bertambahnya permasalahan yang kompleks, baik dari sandang, pangan ataupun kesehatan (Kusnadi, 2013).

WHO menetapkan sistem monitoring TB secara global sehingga sejak saat itulah telah terjadi perputaran waktu sebanyak 20 kali pengumpulan data. Data dari 205 negara dan wilayah, tercatat lebih dari 99% dari populasi dunia mengalami penurunan rata-rata 1,5% per tahun sejak tahun 2000 dan sekarang 18% lebih rendah dari tahun 2000. Pada tahun 2014, TB membunuh 1,5 juta orang sehingga totalnya terdiri dari 890.000 laki-laki, 480.000 perempuan dan 140.000 anak-anak (WHO, 2015).

TB di seluruh dunia telah menyebabkan suatu penyakit, diperkirakan 9,6 juta yakni pada tahun 2014 yaitu 5,4 juta orang, 3,2 juta perempuan dan 1,0 juta anak-anak. Pada tahun 2014, 6 juta kasus

baru TB dilaporkan WHO, kurang dari dua pertiga (63%) dari 9,6 juta orang diperkirakan telah jatuh sakit. Dari 480.000 kasus yang menderita TB yang diperkirakan terjadi pada tahun 2014, hanya sekitar seperempat dari 123.000 yang terdeteksi dan dilaporkan. Secara global, hanya 50% dari pasien yang menderita TB berhasil diobati. Namun, tahun 2015 sasaran pengobatan mencapai keberhasilan 75% untuk pasien dengan penderita TB dan dicapai oleh 43 dari 127 negara serta wilayah yang melaporkan hasil untuk tahun 2012, termasuk tiga negara dengan angka penderita TB tertinggi (Estonia, Ethiopia dan Myanmar) (WHO, 2015).

Di Indonesia, angka yang menunjukkan jumlah penduduk pasien TB yang ditemukan, tercatat di 100.000 penduduk pada suatu wilayah. Berdasarkan data ini ditemukan bahwa angka penemuan penderita TB di wilayah Indonesia sebanyak 135 kasus/100.000 penduduk yang terkena penyakit ini (Kemenkes, 2015).

Provinsi Sulawesi Selatan, ditemukan sebanyak 147 kasus penduduk yang menderita penyakit TB. Khusus di Kota Makassar,

berdasarkan data yang diperoleh dari Bidang Bina Pencegahan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Dinas Kesehatan Kota Makassar, angka penemuan penderita baru TB Paru BTA (+) tahun 2013 sebanyak 72,44% (ditemukan 1.811 penderita dari sebanyak 2.500 sasaran), jumlah ini meningkat dari tahun 2012 dengan jumlah penderita sebanyak 1.324 dari 1.641 sasaran. Jika dibandingkan target 2013 sebesar 70% maka tingkat capaian melebihi target dengan persentase capaian 72,44%. Penemuan penyakit TB dilakukan oleh pengelola TB masing-masing puskesmas melalui pelacakan/pencarian kasus baru, pelacakan penderita *mangkir* dan pemeriksaan kontak (Kemenkes, 2015 dan Dinkes Makassar, 2014).

Immunodiagnostik TB telah dikembangkan sejak akhir abad 19 untuk mendeteksi antibodi yang dibentuk oleh individu yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* akibat invasi dari bakteri ini dengan metode *Immunochromatography* (ICT-TB rapid test). Pada tahun 2011, WHO menerbitkan suatu pendapat yang berisi bahwa tidak direkomendasikan penggunaan reagen komersial serodiagnostik untuk deteksi antibodi TB dalam penegakan diagnosis TB dikarenakan adanya sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan yang sangat bervariasi (Weyer, *et al.*, 2011).

Pembentukan antibodi terhadap antigen *Mycobacterium tuberculosis* memerlukan waktu lama karena infeksi bakteri ini merupakan reaksi hipersensitivitas tipe lambat dan lebih melibatkan respon imun seluler dibandingkan respon imun humoral dalam patogenesisnya sehingga pemeriksaan ini tidak dapat mendeteksi penyakit TB secara dini (Mathur, *et al.*, 1999).

Pemeriksaan penunjang yang digunakan untuk mendeteksi terjadinya infeksi TB adalah pemeriksaan uji tuberkulin. Uji tuberkulin mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang cukup tinggi untuk menentukan ada tidaknya infeksi TB, namun demikian uji tuberkulin memiliki kekurangan, di antaranya adalah tidak dapat membedakan antara infeksi laten TB dan penyakit TB aktif serta adanya reaksi silang dengan bacillus calmette guerin (BCG) dan infeksi *Mycobacterium* lainnya (Kaswandani, 2010).

Pengendalian TB adalah diagnosis dan penatalaksanaan infeksi TB laten. Penduduk dengan TB laten, 5-10% diantaranya akan menjadi TB aktif. Deteksi infeksi TB laten tidak memiliki standar baku, namun saat ini dilakukan dengan *tuberkulin skin test* (TST). Prinsip uji tuberkulin adalah timbulnya hipersensitivitas pada seseorang yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap komponen tuberkulin dari bakteri tersebut yaitu turunan protein yang dimurnikan (*purified protein derivative*/PPD) (Flynn and Chan, 2001 dan Menzies *et al.*, 2007).

Gen Rv 1984c telah diketahui sebagai pengkode protein CFP 21. Fu, *et al.*, 2009 mengatakan bahwa protein CFP 21 dari wilayah RD₂, mampu memperoleh sebuah jenis reaksi hipersensitivitas yang kuat dan mampu menginduksi respon IFN- γ yang sangat tinggi pada pasien TB. Gen yang mengkode protein ini diketahui memiliki enzim esterase yang mampu mengkatalis pembentukan ikatan ester (esterifikasi) dan pertukaran ikatan ester (transeterifikasi) pada media bukan air.

Sensitif dan tes spesifik untuk diagnosis infeksi TB laten sangat efektif untuk mengontrol pencegahan TB. Identifikasi antigen *Mycobacterium tuberculosis* yang khusus untuk studi genomik mikobakteria memungkinkan generasi baru dalam pengembangan tes diagnostik. Identifikasi target baru untuk mendeteksi TB Laten merupakan prioritas tinggi. Wilayah RD₂ terbatas pada kompleks *Mycobacterium tuberculosis* tapi tidak ditemukan di substrains BCG setelah tahun 1931 (Fu, *et al.*, 2009).

Berdasarkan latar belakang, untuk menangani penderita TB yang semakin meningkat maka dilakukanlah pencarian antigen *Mycobacterium tuberculosis* yang reaktif terhadap serum penderita tuberkulosis laten dengan cara mengisolasi dan mengamplifikasi gen Rv 1984c pengkode protein CFP 21 *Mycobacterium tuberculosis*.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan adalah laminar air flow (labconco), tabung reaksi, cawan petridish, erlenmeyer (pyrex), mikrotip (eppendorf), mikropipet (biorad), sentrifuse (profuge), vortex (heidolph), tabung eppendorf, rak tabung eppendorf, kulkas (LG), freezer (GEA), ice maker (hoshizaki), mesin elektroforesis (biorad), power supply (power pac 100 biorad), waterbath (memmert), timbangan (kern ew) gelas ukur (pyrex), mikrowave (sharp), botol reagen, perangkat UV light, inkubator shaker (heidolph), inkubator 1000 (heidolph), titramax 1000, inkubator (memmert), geldoc (biorad), tabung 1,5 ml dan 0,5 ml (axygen), tabung 50 ml (iwaki), autoklaf (hirayama), PCR (gene amp PCR system 9700).

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sputum penderita tuberkulosis, NaOH, sodium sitrat, N-asetil-Lsistein, media lowenstein jensen, telur bebek, alkohol, larutan kinyoun, HCL alkohol, *metylen blue*, kit ekstraksi DNA kromosom, primer, agarosa, enzim tag polymerase, PCR Mix, Et-Br, marker DNA, aquades steril PCR, buffer PCR, buffer TAE, loading buffer.

Prosedur Kerja

1. Sampel

Sampel yang akan diteliti diperoleh dari sputum penderita tuberkulosis dari Rumah Sakit Wahidin, Makassar.

2. Dekontaminasi Sputum

Sputum penderita TB didekontaminasi dengan menambahkan zat dekontaminan yaitu NaOH, Sodium sitrat dan N asetil-L-sistein, kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm. Endapan diencerkan dengan phosphate buffer saline (PBS) atau akuades steril. Sputum siap untuk di kultur dalam medium lowenstein jensen.

3. Kultur *Mycobacterium tuberculosis*

Dilakukan dalam medium lowenstein jensen. Ditimbang media LJ sebanyak 37,5 gr dalam 600 ml aquades. Media LJ kemudian diletakkan di *hot plate*. Direndam telur dengan alkohol selama 10 menit. Selanjutnya telur dipecahkan kemudian dimasukkan dalam gelas ukur sekitar 250 ml. Telur kemudian dituangkan ke dalam media LJ dan ditunggu hingga homogen. Media yang sudah homogen kemudian disaring dengan menggunakan kain

kasa dan dilakukan sebanyak 2x penyaringan. Media kemudian di inkubasi dalam autoklaf. Medium LJ kemudian dipindahkan ke dalam 6 tabung dan ke dalam masing-masing tabung ditambahkan isolat bakteri *M.tuberculosis* kemudian dipadatkan pada suhu 86⁰C. Pertumbuhan *M.tuberculosis* diamati selama 6 minggu.

4. Pewarnaan Kinyoun

Koloni diperiksa kebenarannya dengan pewarnaan Kinyoun. Gelas objek ditempatkan pada rak yang tersedia dan dituangkan zat warna Kinyoun. Didiamkan selama 3 menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Ditetaskan lagi HCl alkohol 3% selama 3 menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Pewarnaan dilakukan dengan metilen biru 0,3% selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan kering. Dilakukan pengamatan koloni *M.tuberculosis* di bawah mikroskop.

5. Isolasi DNA

Sampel dipindahkan ke tabung eppendorf masing-masing sebanyak 5 ml. Sel dimatikan terlebih dahulu di suhu 95⁰C sekitar 30-60 menit, kemudian disentrifuse 8000 rpm selama 5 menit. Dibuang supernatan dan ditambahkan 150 RBC Lysis Buffer.

GB buffer ditambahkan sebanyak 200 µl kemudian di vortex dan di inkubasi selama 10 menit. Di homogenkan kembali (Inversi) setiap 3 menit. Selanjutnya disiapkan Elution Buffer sebanyak 100-200 µl. Untuk 1 sampel dilakukan pemanasan pada suhu 60⁰C. Tambahkan etanol absolut sebanyak 200 µl kemudian divortex selama 10 detik. Siapkan GD Column lalu

pindahkan sampel ke GD column. Sentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 2 menit. Buang endapan cairan kemudian ganti *collection tube*.

W₁ buffer ditambahkan sebanyak 400 µl kemudian disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Buang endapan lalu ganti *collection tube*. Tambahkan 600 µl wash buffer yang sudah ditambah dengan etanol. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit. Buang cairannya dan pindahkan GD column ke *collection tube*. Sentrifuse selama 2 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Pindahkan GD column ke eppendorf 1,5 ml. Tambahkan 100 µl Pre heated elution buffer dalam GD column. Diamkan selama 3 menit kemudian sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 menit. Hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20⁰C.

6. Amplifikasi protein CFP 21 *Mycobacterium tuberculosis* dengan PCR

Sebelum melakukan proses amplifikasi dengan PCR, PCR Mix dibuat terlebih dahulu. PCR Mix dibuat dengan mencampurkan Enzim Go Taq Green Master MIX 12,5 µl, Primer 20 (µM) F¹ 1 µl, Primer 20 (µM) R¹ 1 µl, Aquades 5,5 µl dan sampel DNA 5 µl yang telah diekstraksi dan dimasukkan ke dalam tabung vial PCR. Kontrol positif berupa tabung vial yang memiliki DNA *M.tuberculosis* sedangkan kontrol negatif berupa tabung vial yang berisi air destilata yang tidak ditambahkan template DNA. PCR dilakukan selama 2 jam.

Untuk amplifikasi protein CFP 21 primer spesifik yang digunakan ialah untuk primer Forward (5'-GAT CCG TGT TCG GAC ATC GCG GT-3' dan Reverse

(5'-TCC GCC GTG ATC GAG CCT GTT CGC -3').

Kondisi PCR yang digunakan adalah pra denaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi awal 94°C selama 1 menit, penempelan primer 60°C selama 2 menit, dan elongasi pada 72°C selama 45 detik. Pemanjangan fragmen DNA akhir pada 72°C selama 5 menit dan reaksi dilakukan sebanyak 30 siklus. Produk PCR protein CFP 21 yang diharapkan berukuran 608 pb. Amplikon divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1,5% dan diwarnai dengan ethidium bromide.

7. Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis

Gel agarose 1,5 % dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 0,759 gr agarosa dengan 50 ml bufer TBE (Tris-Buffer-EDTA) di erlenmeyer kemudian dipanaskan dengan microwave selama 1 menit kemudian ditambahkan 2µl ethidium bromide dan dihomogenkan. Cairan gel lalu didinginkan pada suhu kamar. Setelah agak dingin cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel kemudian 7 µl produk amplifikasi di campur dengan 2 µl loading dye.

Setelah tercampur dengan baik, masing-masing sampel dimasukkan ke dalam sumur gel agarose 1,5 % yang telah terendam dalam tangki yang berisi TBE (Tris-Buffer-EDTA). Dimasukkan juga 3 µl marker DNA ke dalam sumur gel agarosa kemudian elektroforesis dijalankan dengan tegangan 100 volt hingga sampel berada pada $\frac{3}{4}$ dari volume. Setelah dielektroforesis sampel kemudian diamati pada sinar ultraviolet (UV) pada *gel doc*.

Analisis Data

Hasil isolasi dan amplifikasi gen Rv 1984c pengkode protein CFP 21 dianalisis berdasarkan ada tidaknya pita DNA yang terbentuk dan data disajikan secara deskriptif dengan menggunakan gambar hasil elektroforesis gel agarosa 1,5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolat *Mycobacterium tuberculosis*

Pada penelitian ini bakteri *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh dari sputum penderita TB. Selanjutnya dilakukan dekontaminasi sputum agar kuman berkelompok, sehingga lebih mudah mendapatkan mikobakteria dalam jumlah besar. Tindakan dekontaminasi juga diperlukan untuk membunuh kuman selain mikobakteria misalnya flora normal dan jamur.

Kultur *M.tuberculosis* dilakukan dalam medium lowenstein-jensen (LJ). Medium LJ merupakan medium berbasis telur yang dilengkapi dengan asam lemak dan protein untuk metabolisme mikobakteria. Medium padat berbasis telur ini pembuatannya lebih mudah, murah, dapat disimpan dalam waktu yang lama dan dapat digunakan untuk identifikasi awal mikobakterium, tetapi medium ini memerlukan waktu yang lama untuk mendeteksi pertumbuhan *M.tuberculosis* dalam bentuk koloni (PML Microbiological 1989 dan Forbes 1998).

Koloni kemudian diperiksa kebenarannya dengan pewarnaan kinyoun dimana tidak diperlukan adanya pemanasan terhadap warna primer (larutan kinyoun). Pemeriksaan dengan menggunakan pewarnaan kinyoun dianggap lebih praktis, cukup unggul dan memerlukan waktu yang singkat.

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* mengandung sejumlah besar zat lipid pada dinding selnya dan menyebabkan dinding sel tersebut relatif tidak dapat ditembus oleh zat-zat warna umum, sehingga sel tersebut tidak terwarnai oleh metode-metode pewarnaan biasa sehingga bakteri ini disebut bakteri tahan asam.

B. Isolasi DNA

Isolasi gen bakteri *Mycobacterium tuberculosis* telah berhasil dilakukan menggunakan Genomic Dna Mini KIT (GENEAID). Prinsip isolasi DNA pada dasarnya terdiri dari 4 tahap utama; (1). Lisis sel untuk mengeluarkan materi genetik, dapat berupa DNA dan RNA. (2). Mengeliminasi RNA dan protein pengikat dengan penambahan enzim dan reagen pendenaturasi protein. (3). Pengendapan debris protein dengan sentrifugasi agar larutan DNA dapat dipisahkan dengan mudah. (4). Pengendapan DNA dengan isopropanol, sentrifugasi untuk memisahkan presipitat DNA dan dilanjutkan pencucian dengan etanol 70% untuk memperoleh hasil ekstraksi DNA dengan kemurnian yang baik. Tujuan dilakukannya ekstraksi DNA ialah untuk memisahkan genom DNA dari molekul lain yang terdapat didalam sel. Pada tahapan ini ekstraksi DNA dilakukan secara kimiawi dengan menggunakan metode Boom. Metode Boom merupakan metode untuk memecahkan DNA dan pengaktifan asam nukleat.

Pemecahan sel dilakukan dengan penambahan RBC Lysis buffer dan GB buffer yang berfungsi membantu pelisisan membran sel secara kimiawi. Pada saat sel pecah (lisis) DNA langsung diikat dengan

suspensi diatom yang memasuki pori-pori dari diatom akibat adanya gaya tarik menarik dari *silica*. DNA yang diperoleh belum murni karena masih terdapat protein dan RNA dalam jumlah yang cukup besar dimana RNA tersebut berasosiasi kuat dengan DNA sehingga perlu dilakukan pembersihan debris sel.

Tahap selanjutnya ialah penambahan Elution Buffer. EB merupakan larutan penyangga pH yang berfungsi mempertahankan sifat isotonis suatu larutan untuk menjaga DNA selama proses penyimpanan. Larutan etanol berfungsi untuk memekatkan dan menyatukan DNA dengan diatom. Pencucian terakhir dilakukan dengan menggunakan W₁ Buffer yang berfungsi untuk membersihkan DNA dari pengotor lain.

Tahap akhir dari metode ini ialah dengan menambahkan wash buffer, dimana wash buffer ini berfungsi untuk dehidrasi DNA yakni membantu melepaskan dan menarik DNA keluar dari diatom. Setelah proses dehidrasi selesai maka dihasilkan produk DNA.

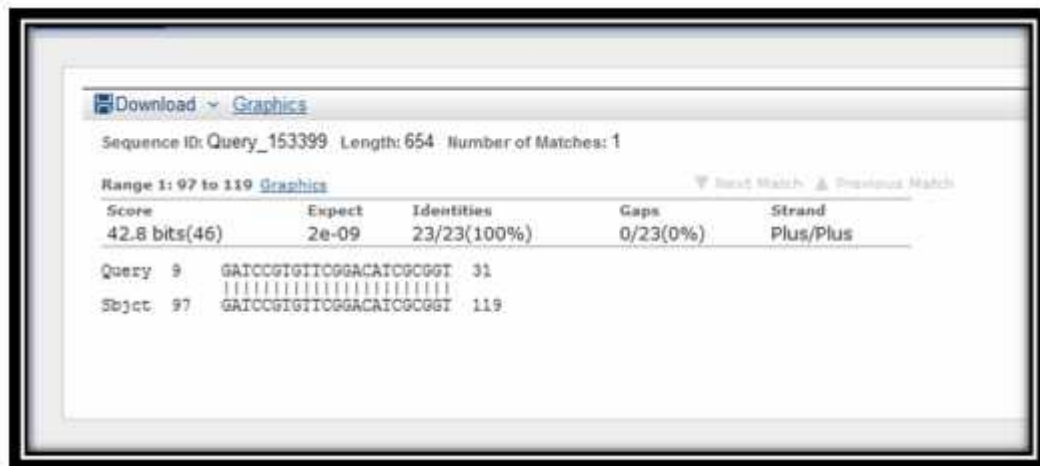
C. Amplifikasi Gen Rv 1984c *Mycobacterium tuberculosis* dengan PCR

a. Hasil Blast urutan primer dengan urutan nukleotida

Sampel DNA hasil isolasi kemudian diamplifikasi menggunakan primer spesifik untuk Gen Rv 1984c yakni Forward (5'-GAT CCG TGT TCG GAC ATC GCG GT-3' dan Reverse (5'-TCC GCC GTG ATC GAG CCT GTT CGC -3'). Pasangan primer Rv 1984c tersebut dirancang untuk menghasilkan produk amplifikasi yang mengandung protein CFP 21 dengan ukuran 608 bp.

Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database Gene Bank*.

Untuk mengetahui ketepatan penggunaan primer spesifik tersebut maka dilakukanlah proses BLAST pada NCBI dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.



Download [Graphics](#)

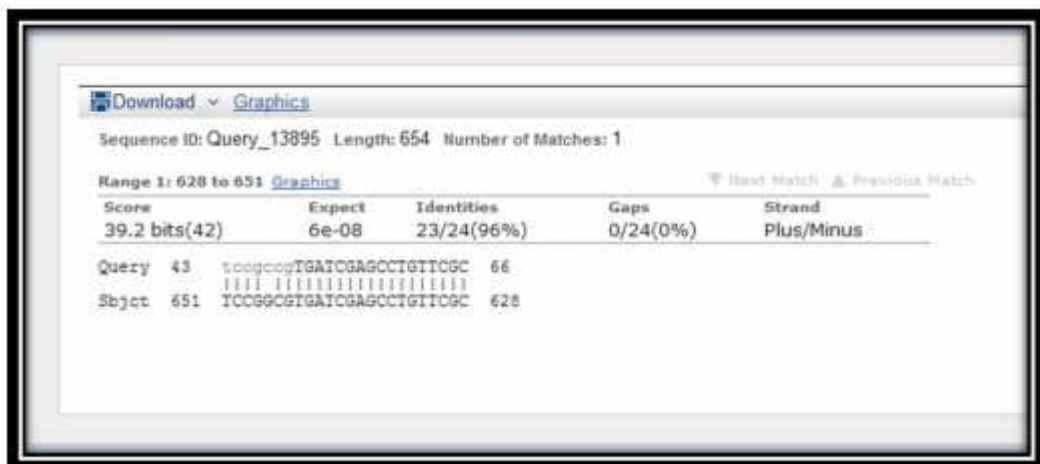
Sequence ID: Query_153399 Length: 654 Number of Matches: 1

Range 1: 97 to 119 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
42.8 bits(46)	2e-09	23/23(100%)	0/23(0%)	Plus/Plus

Query 9 GATCCGTTTCGGACATCGCGT 31
 Sbjct 97 GATCCGTTTCGGACATCGCGT 119

Gambar 1. Hasil BLAST untuk primer Forward



Download [Graphics](#)

Sequence ID: Query_13895 Length: 654 Number of Matches: 1

Range 1: 628 to 651 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	6e-08	23/24(96%)	0/24(0%)	Plus/Minus

Query 43 TCCGCGTGTGATCGAGCCTGTTGCG 66
 Sbjct 651 TCCGCGTGTGATCGAGCCTGTTGCG 628

Gambar 2. Hasil BLAST untuk primer Reverse

Identitas dari suatu gen yang telah diketahui sekuennya dapat ditentukan dengan cara membandingkan data sekuen gen tersebut yang terdapat pada *Gene Bank*, salah satunya ialah NCBI. Blast NCBI merupakan suatu cara yang digunakan untuk memverifikasi mengenai organisme apa saja yang memiliki kesamaan urutan DNA

dengan sampel yang diteliti, sehingga hasil dari BLAST NCBI mampu memberikan informasi tentang *Query Coverage* atau presentasi panjang nukleotida yang selaras dengan database pada BLAST dan *Max Identity* atau nilai tertinggi dari kecocokan antara sekuens query dengan sekuens database yang disejajarkan.

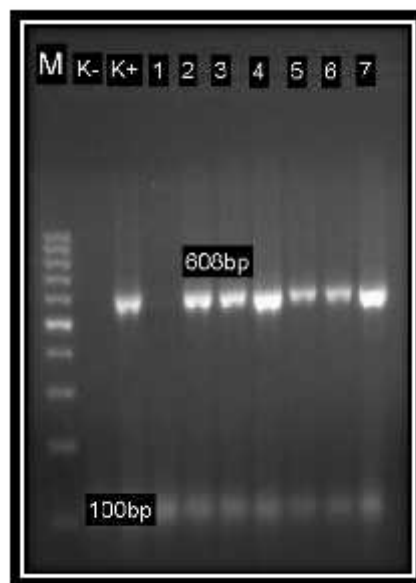
Berdasarkan hasil BLAST protein CFP 21 dari NCBI terhadap primer forward dan reverse yang digunakan untuk mendeteksi protein CFP 21 memiliki kesamaan sekuens DNA dengan gen bank untuk nukleotida protein CFP 21 ialah sebesar 100% dan 96% yang artinya bahwa penggunaan primer yang digunakan ialah benar.

b. Visualisasi Hasil Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahapan berulang atau siklus dan pada tiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. PCR merupakan teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara invitro yang mampu menghasilkan sejumlah besar fragmen DNA

spesifik dengan panjang sekuens yang telah ditentukan dari sejumlah kecil template.

Pada proses PCR digunakan primer spesifik yaitu Forward (5'-GAT CCG TGT TCG GAC ATC GCG GT-3' dan Reverse (5'-TCC GCC GTG ATC GAG CCT GTT CGC -3'). Dari amplifikasi PCR pada sampel yang telah diisolasi menggunakan primer yang spesifik selanjutnya dilakukan visualisasi pada elektroforesis sehingga diketahui panjang dari lokus adalah 608 bp. Hasil visualisasi dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil Amplifikasi Sampel dengan primer spesifik
Ket. M : Marker dengan ukuran 100 bp, K⁽⁻⁾ : Kontrol Negatif, K⁽⁺⁾ : Kontrol Positif, 1-7 : Sampel

Hasil amplifikasi seperti pada Gambar 3 menunjukkan bahwa urutan nukleotida primer tersebut

dapat teramplifikasi dengan baik yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA. Hal ini berarti pada sampel

DNA yang digunakan terdapat sejumlah sekuens DNA yang berkomplemen dengan primer. Dengan demikian enzim polymerase dapat bekerja dengan baik untuk mensintesis molekul DNA yang baru dari dNTP.

Muladno (2002) mengatakan bahwa dalam rangkaian proses PCR, setelah primer menempel pada posisi masing-masing, enzim polymerase mulai mensintesis molekul DNA baru yang dimulai dari ujung 3' masing-masing primer. Selain itu ketepatan pengaturan suhu pada saat menjalankan mesin PCR, baik suhu denaturasi, annealing (penempelan) maupun suhu ekstensi menjadi kunci keberhasilan proses amplifikasi. Purwanto (2006) mengatakan bahwa dalam proses denaturasi ikatan non-kovalen yang mempertahankan struktur *double helix* DNA akan terputus. Hal ini dapat dilakukan dengan memaparkan DNA pada temperatur tinggi, pH ekstrim, konsentrasi ion rendah dan beberapa pelarut yang dapat menimbulkan denaturasi. Selanjutnya Muladno (2002) mengatakan bahwa suhu denaturasi dan ekstensi bersifat permanen, masing-masing 95⁰C dan 72⁰C sedangkan suhu penempelan bergantung pada panjang pendeknya primer.

Terdapat perbedaan ketebalan pita DNA pada ke 7 sampel. Pita DNA 4 dan 7 yang teramplifikasi lebih tebal dibandingkan dengan pita sampel lainnya. Hasil amplifikasi juga belum terbebas dari pengotor, yakni sisa-sisa primer dan dNTP yang terlihat dibagian bawah pita DNA.

Prinsip dasar pembuktian keberadaan protein CFP 21 adalah sebagai berikut, sampel yang memiliki protein CFP 21 akan teramplifikasi dengan reaksi PCR

dan terdeteksi sebagai pita amplikon ketika di running dengan elektroforesis gel agarosa. Hal ini dapat terjadi karena gel yang digunakan akan menempel pada protein target yaitu protein CFP 21. Enzim Taq DNA polymerase kemudian akan mengkatalis reaksi polymerase secara terus menerus sehingga akan didapatkan sejumlah besar DNA hasil amplifikasi pada tahap akhir reaksi. DNA dalam jumlah besar akan menumpuk pada satu tempat ketika dilakukan proses elektroforesis dan ketika divisualisasi dengan UV akan terlihat sebagai pita amplikon. Panjang amplikon yang terbentuk adalah sejumlah nukleotida yang terdapat diantara primer forward dan primer reverse, yaitu sebesar 608 bp.

Protein CFP 21 adalah protein imunodominan yang dikodekan di wilayah RD₂ dan menginduksi pelepasan IFN- yang sangat tinggi dari sel darah pasien TB sehingga antigen ini merupakan kandidat yang cocok untuk TB yang berbasis tes diagnostik. Antigen dari wilayah RD₂ ini, mampu untuk memperoleh sebuah jenis reaksi hipersensitivitas yang kuat dan mampu menginduksi respon IFN- yang sangat tinggi pada pasien TB (Fu, *et al.*, 2009).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa hasil isolasi dan amplifikasi gen Rv 1984c dari *Mycobacterium tuberculosis* diperoleh satu pita DNA berukuran 608 bp.

DAFTAR PUSTAKA

Dinas Kesehatan Kota Makassar, 2014. **Profil Kesehatan**

- Kota Makassar 2013.
Makassar.
- Flynn J., L. and John Chan, 2001. **Tuberculosis: Latency and Reactivation, Infection and Immunity**. 69 (7) : 4195–4201.
- Fu, R., C Wang, C. Shi M. Lu, F. Wang dan X. Fan, 2009. **An Improved Whoe-Blood Gamma Interferon Assay Based on the CFP 21-MPT 64 Fusion Protein. Clinical and Vaccine Immunology**. 16 (5) : 686-691.
- Forbes, B. A, Sahn, D.F, Weissfeld AS. Bailey & Scott, 1998. **Diagnostic Microbiology**.
- Kaswandi, N., Darmawan, B. S., Nastiti, N. R., 2010. **Akurasi Polymerase Chain Reaction (PCR) dibandingkan Uji Tuberkulin untuk Diagnosa Tuberkulosis pada anak**. Jurnal Kesehatan 12 (1) : 43.
- Kementrian Kesehatan RI, 2015, **Infodatin**. Pusatdatin. Jakarta.
- Kusnadi, A., 2013. **Perancangan Aplikasi Sistem Pakar untuk Mendiagnosa Penyakit pada Manusia**. Ultimatics 4 (1) : 1.
- Mathur, M. L., LoBue, P. A., dan Catanzaro, A., 1999. **Evaluation of a Serologic Test for the Diagnosis of Tuberculosis**. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 732-5.
- Muladno, 2002. **Seputar Teknologi Rekayasa Genetika**. Bogor. Pustaka Wirausaha Muda.
- PML, Microbiologicals, Inc, 1989. **Lowenstein-Jensen Media**.
- Purwanto, D. A., **Teknik Optimasi PCR**. Surabaya. Fakultas Farmasi UNAIR Press.
- Weyer, K., Mirzayev, F., Gemert, W. V. dan Gilpin, C., 2011. **Commercial Serodiagnostic Test for Diagnosis of Tuberculosis**. Geneva. World Health Organization Press.
- WHO, 2015. **Global Tuberculosis Report**. World Health Organization.